

بیان ژن های EGFR و FGFR4 در مبتلایان به سرطان ریه

متانت چیت ساز (MSc)^۱، اردشیر حسام پور (PhD)^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۹/۵، اصلاح: ۹۶/۱۲/۵، پذیرش: ۹۷/۱/۲۸

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان ریه اختلالی است که به دلیل تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی ایجاد و باعث فعال شدن انکوژن ها و غیر فعال شدن ژن های سرکوب گر تومور آغاز می شود. هدف از این تحقیق بررسی کمی بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه نسبت به افراد سالم و بررسی نقش این دو ژن به عنوان بیومارکر جهت غربالگری می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهد بر روی ۵۰ نمونه خون افراد مبتلا به سرطان سینه در مقایسه با ۵۰ نمونه کنترل نرمال انجام شد. RNA تام استخراج و cDNA سنتز و بیان بیومارکرهای EGFR و FGFR4 نسبت به ژن مرجع GAPDH با استفاده از تکنیک Real Time PCR در نمونه های دو گروه بررسی کمی شد. **یافته ها:** افزایش معنی داری در بیان بیومارکرهای هدف در افراد سرطانی نسبت به نرمال مشاهده شد. به طوریکه ژن های FGFR4 و EGFR به ترتیب ۴/۴۶ و ۳/۰۳ برابر ($p=0/003$) افزایش بیان نشان دادند. همچنین grade بیماری با میزان بیان بیومارکرها ارتباط معنی داری نشان داد به طوریکه با افزایش مرحله و درجه شدت سرطان بیان بیومارکرها افزایش یافت ($p=0/003$).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه از بیان ژن های EGFR و FGFR4 می توان به عنوان بیومارکرهای احتمالی هدف جهت غربالگری غیر تهاجمی در تشخیص زود هنگام سرطان ریه استفاده نمود.

واژه های کلیدی: EGFR , FGFR4 , Real Time PCR , مارکر، سرطان ریه.

مقدمه

غیر وابسته به سیگار در ایران بیشتر از آمار سایر کشورها است. محققین علت احتمالی این تفاوت را آلودگی هوای شهرهای بزرگ ایران می دانند. طبق آمار حدود ۱ تا ۲ درصد احتمال خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش می دهد(۵). برعکس برخی از سرطان های شایع دیگر سرطان ریه به شکل کلاسیک خانوادگی اتفاق نمی افتد. با این حال شواهد بسیاری وجود دارد که نشان می دهد در افرادی که سابقه خانوادگی مبتلا به سرطان ریه دارند حتی در صورتی که این افراد سیگاری نباشند، خطر ابتلا به سرطان ریه در آنها افزایش می یابد ولی درصد کمی از موارد سرطان ریه به دلیل عوامل ارثی ایجاد می شود (۶). به طور کلی اکثریت عمده عوامل ژنتیکی ژن های تغییر یافته کد کننده پروتئین هایی هستند که در سیگنالینگ گیرنده های تیروزین کینازی (RTK) نقش دارند و باعث گسترش Non-Small Cell Lung cancer (NSCLC) می شوند (۷). چندین تغییر ژنتیکی در سرطان ریه شناخته شده است. جهش ها در تعدادی از پروتئوکژن ها از جمله BRAF, PI3K, EGFR, KRAS, MEK, HER2 شناسایی شد(۸). جهش در انکوژن KRAS نیز مسئول ۱۰ تا ۳۰ درصد از سرطان های ریه می باشد (۹). TP53 جهش در ژن PTEN و یا حذف در آن،

سرطان ریه نوعی بیماری است که مشخصه آن رشد کنترل نشده سلول در بافت های ریه است. اگر این بیماری درمان نشود رشد سلولی می تواند در طی متاستاز به بیرون ریه گسترش پیدا کند و به بافت های اطراف یا سایر اعضای بدن برسد (۱). کارسینوما سلول غیر کوچک شایع ترین نوع سرطان می باشد و خود شامل سه نوع، کارسینوما سلول سنگفرشی، آدنوکارسینوما و کارسینوما سلول بزرگ می باشد. ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان ریه در حال حاضر در مرحله پیشرفته بیماری (مراحل III و IV) به سر می برند (۲). ابتلا به سرطان ریه، شامل علل مختلفی می باشد. سیگار دلیل ۹۰٪ از سرطان های ریه را شامل می شود. دود سیگار ترکیب پیچیده ای از مواد شیمیایی حاوی ۷۳ ماده سرطان زا شناخته شده می باشد. ۹۰٪ از مرگ و میرهای ناشی از سرطان در مردان و ۷۰٪ در زنان در سال ۲۰۰۰ به علت استعمال دخانیات بوده است. سیگار ابتلا به سرطان ریه را تا ۲۰ برابر افزایش می دهد (۳). سرطان ریه سرطانی شایع می باشد که رتبه یک را در مردان و رتبه چهارم را در زنان دارد. بروز سرطان ریه ممکن است مرتبط با آلودگی هوای ناشی از صنعتی شدن و افزایش استفاده از اتومبیل در شهر ها باشد (۴). مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهد که میزان بروز سرطان های ریه

این مقاله حاصل پایان نامه متانت چیت ساز دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی-ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر اردشیر حسام پور

آدرس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۲۱-۴۴۶۰۰۱۸۲

E-mail: a.hesampour@gmail.com

اعلام گردید. به همراه پرسشنامه و رضایت‌نامه و با رعایت قوانین اخلاق در مطالعات تجربی پزشکی Helsinki و تبعیت از دستورالعمل‌های مربوطه از قسمت پاتولوژی بیمارستان مسیح دانشوری به جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری نمونه خون با رعایت اصول انتقال و نگهداری به بانک ازت و فریزر ۸۰- درجه منتقل شد. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی رعایت گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA تام از نمونه‌های خون با استفاده از کیت GeneAll انجام شد و نمونه‌های استخراج شده توسط اسپکترومتر نانودراپ (Thermo scientific, Germany) سنجش کمی و توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی کیفی شد و از نمونه‌هایی که نتایج نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آنها بین ۱/۸-۲ داشتند جهت سنتز cDNA استفاده شد. یک میکرولیتر از RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, cDNA Applied (Thermo Fisher, #K1622 داخل دستگاه ترموسایکلر (ABI Biosystem) مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر PCR: برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار version 3 (Applied Biosystems, Austin, Primer Express software TX, USA) و همچنین سایت NCBI استفاده شد که پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است. توالی ژن GAPDH که به عنوان شاهد داخلی مورد استفاده قرار گرفته است

انجام آزمون Real time PCR: آزمون Real time PCR با استفاده از کیت SYBR 480 Master mix (Roche Applied Science) ساخت شرکت Roche با برنامه حرارتی به شرح واسرشت سازی اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه است. مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه (cycles) با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و ۶۱ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. میزان فلورسنت توسط دستگاه ۶۰۰۰ rotor-gene ساخت کمپانی Corbet استرالیا انجام شد و منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم افزار رسم و آنالیز شد. جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و تکثیر قطعات، محصول واکنش Real Time PCR پس از بررسی توسط نانودراپ روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی و صحت اندازه قطعات حاصل از تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تایید تکثیر روی ژل آگارز در شکل ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن های EGFR و FGFR4 به همراه کنترل GAPDH پرایمر

توالی		
5-AGGCACGAGTAACAAGCTCAC-3	F	EGFR
5- ATGAGGACATAACCAGCCACC-3	R	
5- GGTGGCTGAAAAACGGGAAG-3	F	FGFR4
5- AGATGGGACCACACTTTCAT A-3	R	
5-CTCTCTGCTCCTCCTGTTCTG-3	F	GAPDH
5-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3	R	

باعث ۲۰-۱۵ درصد از کارسینوماهای سلول سنگفرشی می‌شود (۱۲-۱۰). مطالعات متعددی نیز در بررسی بیومارکرهای دخیل در سرطان ریه انجام شد. به طوریکه Pao و همکاران مطالعاتی در سطح آنالیز ژنومی به منظور تعیین بیومارکرهای احتمالی دخیل در سرطان ریه را انجام و تعدادی بیومارکرهدف شناسایی شد (۱۳). همچنین Asgari و همکاران نقش تغییرات بیانی و ایجاد سرطان ریه و پروستات را بررسی نموده و ۱۹ ژن را به عنوان بیومارکرهای احتمالی شناسایی نمودند (۱۴). EGFR نوعی آنکوژن و متعلق به خانواده ERbb است و ژن آن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۷ در موقعیت ۹ و ۱۲ واقع شده است و از ۲۸ اگزون به طول ۱۱۸ کیلو جفت باز تشکیل شده است. EGFR (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال) یک نقش حیاتی در تنظیم و تکثیر طبیعی سلول، آپوپتوز و عملکرد های سلول دارا می باشد. تقریباً ۱۰ درصد از بیماران مبتلا به NSCLC در ایالت متحده و ۳۵ درصد در شرق آسیا مرتبط با جهش EGFR می باشند (۱۱).

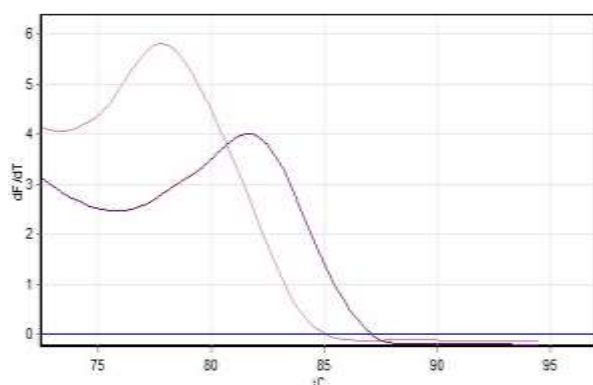
ساختار EGFR ماهیت تیروزین دارد و نقش در فعال سازی مسیرهای مختلف PI3K/AKT (فسفو اینوزیتول تری کیناز) و RAS/RAF و همچنین MAPK دارد (۱۲). شایعترین جهش شناخته شده در این ژن در اگزون های ۱۹ و ۲۱ می باشد که ۸۹٪ از جهش ها را شامل می شود (۱۵). جهش EGFR در بیماران SCLC کم تر از NSCLC می باشد و تنها حدود ۴ درصد از بیماران از نوع SCLC این جهش را نشان می دهند. خانواده گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGFR) با چهار عضو مرتبط هستند که با گیرنده های تیروزین کینازی نقش حیاتی در تکثیر سلولی، تومور، رگ زایی، مهاجرت و بقاء دارند. خانواده FGFR شامل چهار گیرنده تیروزین کینازی پس از اتصال با فعال شدن پروتئین کیناز MAPK و فسفر ۳ اینوزیتول کیناز (PI3K) در مسیر سرطانی شدن قرار می گیرد (۱۶ و ۱۷).

پلی مورفیسم Gly388Arg در FGFR4 به طور کلی یک نقطه داغ در تغییرات مربوط به سرطان ریه می باشد. در پاسخ به بیش از ۲۰ نوع لیگاند شناخته شده و فعال شدن مسیر MAPK عمل می کند (۱۶). اخیراً پژوهش هایی در ارتباط مستقیم تغییرات سطح بیان SATB1 و Ki-67 و مکانیسم ایجاد کارسینوما ریه Non-small Cell Lung مشاهده شد (۱۸ و ۱۹). با توجه به شیوع روز افزون سرطان ریه، طراحی روشی غیر تهاجمی، کمی با قدرت تشخیص زودهنگام جهت بررسی و شناسایی بیومارکرهای مرتبط با سرطان ریه می تواند نقش بسزایی در پیش آگهی، تشخیص، واکنش به درمان با داروهای هدفمند و پایش درمان سرطان داشته باشد.

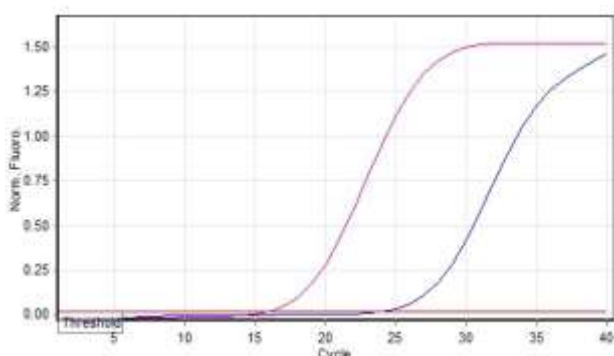
هدف از این تحقیق بررسی کمی بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه نسبت به افراد شاهد سالم و بررسی نقش این دو ژن به عنوان بیومارکر جهت غربالگری می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: در این مطالعه مورد شاهی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران با کد ۳۴۰/۲۲ بر روی ۵۰ نمونه خون مبتلا به سرطان ریه از نوع آدنوکارسینوما و ۵۰ نمونه خون CBC افراد شاهد که جواب بررسی رادیولوژی و آزمایشگاهی آنها در سه دوره متوالی معاینه ۱ ساله منفی



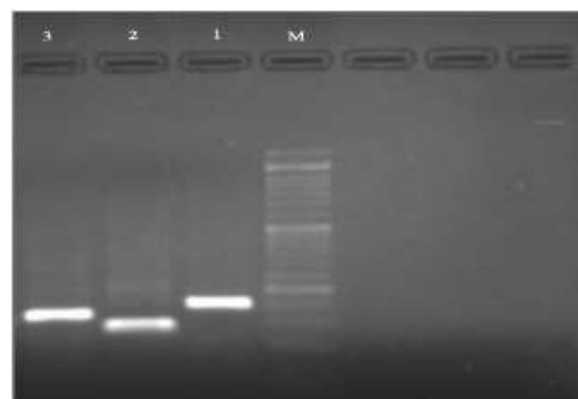
نمودار ۱. منحنی ذوب ژن های EGFR و FGFR4 در رده سلولی سرطان ریه. الگوی منحنی ذوب ژن EGFR در دمای ۸۱/۵ درجه سانتی گراد و الگوی منحنی ذوب ژن FGFR4 در دمای ۷۷/۸ درجه سانتی گراد می باشد. محور عمودی نشان دهنده مشتق فلورسانت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده دما برحسب °C می باشد. تک قله بودن در نمودارها نشانه عدم وجود دایمر پرایمر و باند غیر اختصاصی است.



نمودار ۲. سیکل تزیاید بیومارکرها- محور افقی شماره سیکل تزیاید و محور عمودی میزان فلورسنت می باشد. مقدار CT برای ژن، EGFR ۲۴/۱۰ و برای ژن، FGFR4 ۱۶/۰۱ می باشد

بررسی تغییر بیان نسبی ژن های EGFR و FGFR4: بررسی تغییر بیان نسبی در افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم نشان داد که تغییر بیان نسبی ژن های EGFR و FGFR4 با $p=0.003$ در افراد مبتلا به سرطان ریه به ترتیب 3.34 ± 0.19 و 4.20 ± 0.74 می باشد. همچنین نسبت بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه های کنترل سالم ($p=0.003$) به ترتیب 1.10 ± 0.23 و 0.94 ± 0.11 می باشد که این تغییرات حاکی از بیان افزایشی ژن های EGFR و FGFR4 در مقایسه با افراد سالم می باشد که برای ژن EGFR $3/03$ برابر افزایش بیان نسبت به افراد سالم و برای ژن FGFR4 افزایش بیان $4/46$ برابر نسبت به افراد سالم است.

نتایج نشان می دهد بررسی کمی بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه خون بیماران و افراد مستعد به سرطان ریه به عنوان یک بيو مارکر برای تشخیص و غربالگری سرطان ریه است. در این راستا با شناسایی این دو ژن از خون نتایج نشان داد که میزان بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی داری دارد.



شکل ۱. چاهک ۱ محصول PCR ژن GAPDH می باشد که طول قطعه تکثیری ۲۰۳ جفت باز، می باشد. چاهک ۲ محصول ژن EGFR می باشد که طول قطعه تکثیری ۱۰۴ جفت باز، می باشد. چاهک ۳ محصول ژن FGFR4 می باشد که طول قطعه تکثیری آن ۱۷۷ جفت باز، می باشد. چاهک M مارکر DNA می باشد

آنالیز داده ها و بررسی آماری: داده های خام حاصل از Real Time PCR با استفاده از نرم افزار تجزیه و تحلیل شد. پس از تکثیر، CT (cycle threshold) نمونه ها شناسایی و همچنین PCR efficiency mean تعیین شد. بر اساس روش Relative Quantification (RQ) و فرمولاسیون $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به صورت مضربی از میزان بیان ژن های EGFR و FGFR4 درج شده و در مقایسه با ژن داخلی GAPDH و در مجاور نرمال متوازن مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت. از آزمون های آماری تست کولموگروف اسمیرنوف (جهت بررسی پارامتر سن) و آزمون T-TEST برای بررسی میزان بیان ژن در افراد سالم و بیمار و از آزمون پیروسون به منظور بدست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی (سن و ΔCt) استفاده گردید و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج بررسی نسبت مقدار RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. به منظور بررسی اختصاصیت پرایمر ها، کیفیت رنگ فلورسانت سایبرگرین، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی و عدم وجود دایمر پرایمر در محصول PCR نمودار منحنی ذوب برای ژن های EGFR، FGFR4 و GAPDH به صورت جداگانه توسط دستگاه Rotor gene Q Real time PCR رسم شد. نتایج به صورت تک قله ای به دست آمد که این خود بیانگر تنها یک محصول PCR است (نمودار ۱). در ضمن محصول PCR نیز بر روی ژل قرار گرفت و مشاهده شد که هر کدام از واکنش های انجام شده توسط پرایمرهای اختصاصی تنها یک باند اختصاصی وجود دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه های ما را تایید کرد. نتایج سیکل تزیاید بیان ژن ها در نمودار ۲ ترسیم شده است.

بررسی جمعیت مورد مطالعه: میانگین سنی بیماران در این مطالعه $45/59 \pm 11/25$ و افراد سالم $49/12 \pm 12/40$ سال بود.

تحقیقات دیگری نیز که توسط Fengli و همکاران انجام شد سطوح بیان EGFR و COX-2 با افزایش معنی دار همراه بود و EGFR نه تنها یک عامل پیش آگاهی مستقل برای بقا کلی شناسایی شد، بلکه نشان داده شد یک عامل پیش آگاهی در دریافت کننده های پرتو درمانی می باشد ولی ارتباطی بین بیان COX-2 و بقا کلی در بیماران یافت نشد (۲۵). در مطالعه ای که توسط Willemi و همکاران انجام شد همبستگی مثبتی بین بیان FGFR1 و FGFR2 مشاهده شد (۲۳) که با نتایج افزایش همزمان بیومارکرها در مطالعه اخیر مطابقت دارد که احتمالاً افزایش بیان همزمان دو ژن باعث ایجاد سرطان می شود. FGFR1 و FGFR2 به طور معنی داری با سرطان از نوع سنگ فرشی مرتبط بودند و همچنین بیان بالای FGFR1 با OS مشاهده شد (۲۳). در پژوهشی که برای بررسی بیان ژن های FGFR در سرطان دهانه رحم توسط Che و همکاران انجام شد تجزیه و تحلیل نتایج تایید کرد که بیان FGFR3، FGFR2 و FGFR4 افزایش بیانی داشته و می تواند به عنوان یک شاخص پیش آگاهی مهم در سرطان دهانه رحم باشد (۲۶). از آنجائیکه پروتئین های FGFR4 و EGFR نقش های مختلفی در فعالیتهای بیولوژیکی متعدد به عنوان گیرنده فاکتور رشد در تمایز سلولی، رشد و تکثیر سلولی دارند لذا افزایش بیان این بیومارکر می تواند نقش پروتئین کوژنی داشته و باعث تغییر سیگنالینگ پایین دستی در مسیرهای کنترل سلول شود که احتمالاً باعث پیشرفت سرطان شوند (۲۷ و ۱۹).

همچنین با توجه به افزایش بیان همزمان دو ژن در تمامی نمونههای سرطانی، احتمالاً ارتباط مستقیم و تقویتی در نقش دو ژن به طور همزمان و پیشرفت سرطان ریه است. نتایج مطالعات متعدد بر روی سرطان ریه و سایر سرطان ها، افزایش هم زمان و معنی دار بیان ژن های FGFR4 و EGFR را نشان می دهد. علاوه بر افزایش همزمان معنی دار، ارتباط معنی دار بین میزان افزایش بیان و شدت و درجه بیماری مشاهده می شود. لذا مطالعه کمی این بیومارکرها می تواند به عنوان شناساگر احتمالی در بررسی پیش آگاهی، غربالگری و پایش درمان در سرطان ریه کاربرد داشته باشد (۲۸ و ۱۴). با توجه به افزایش معنی دار بیان ژن های EGFR و FGFR4 در نمونه های خون مبتلا به سرطان در مقایسه با نرمال، می توان به عنوان بیومارکرهای احتمالی هدف جهت غربالگری غیر تهاجمی در تشخیص زودهنگام سرطان ریه استفاده نمود. مطالعات تکمیلی جهت بررسی ارتباط میزان بیان این ژن ها با خصوصیات هیستوپاتولوژی و بالینی بیماران در ادامه مطالعه انجام خواهد شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدرانی می گردد.

بررسی وضعیت مرحله بیماری: در این مطالعه از ۵۰ بیمار ۲۶ (۵۲ درصد) مورد دارای سلول های سرطانی در مرحله ۳ و ۲۴ مورد (۴۸ درصد) در مرحله ۴ سرطان ریه قرار داشتند. در بررسی ارتباط بین مرحله و درجه شدت بیماری در بیماران مشخص شد که بین این دو پارامتر ارتباط معنی داری وجود دارد و پراکندگی فراوانی ها در مرحله و درجه ها یکسان است و با افزایش مرحله و درجه، شدت سرطان نیز افزایش می یابد.

بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان بیومارکرهای در افراد بیمار و سالم: نتایج این بررسی نشان داد که بین پارامتر سن و ΔCt ژن های EGFR و FGFR4 ارتباط معنی داری وجود دارد ($p=0/01$).

بررسی ارتباط بین مرحله و درجه بیماری با میزان بیومارکرهای EGFR و FGFR4: بدین منظور ابتدا داده ها به دو گروه کنترل و بیمار تفکیک شد. نتایج نشان داد بین مرحله بیماری و میزان ΔCt ارتباط معنی داری وجود دارد ($p=0/001$). همین آزمون در مورد درجه بیماری نیز انجام شد و نتایج نشان داد که درجه تمایز سلول های سرطانی یا grade بیماری با میزان بیان نیز EGFR و FGFR4 ارتباط معنی داری دارد ($p=0/003$). همچنین نتایج بیانگر این بود که میزان بیان EGFR و FGFR4 با افزایش مرحله بیماری ارتباط مستقیمی دارد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر تغییرات معنی دار و همزمان بیان ژن های FGFR4 و EGFR با افزایش ۴/۴۶ و ۳/۰۳ برابر در نمونه های مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با نمونه های نرمال را نشان داد. همچنین نتایج ارتباط معنی داری بین شدت و درجه بیماری و افزایش بیان بیومارکرها نشان داد. لذا طراحی روشی غیر تهاجمی با قدرت تشخیص زودهنگام جهت بررسی و شناسایی بیومارکرهای مرتبط با سرطان ریه می تواند نقش بسزایی در پیش آگاهی، تشخیص، واکنش به درمان با داروهای هدفمند و پایش درمان سرطان داشته باشد. نتایج حاضر با پژوهش های انجام شده در ارتباط با تغییرات بیانی بیومارکرها در سرطان های متعدد مطابقت دارد و در بسیاری از موارد نتایج مطالعات پیشین، افزایش معنی دار بیومارکرهای احتمالی دخیل در سرطان ریه را نشان داده است (۲۱ و ۲۰). به طوریکه Liang بیان ژن RBM5، EGFR و KRAS در NSCLC را در مقایسه با نمونه های بافت نرمال بررسی کردند و بیان RBM5 در NSCLC نسبت به بافت های نرمال کاهش یافته بود در حالیکه ژن های EGFR و KRAS در NSCLC نسبت به بافت های طبیعی افزایش یافته بود (۲۲). همچنین نتایج مطالعه Willemi و همکاران همبستگی مثبتی بین بیان ژن FGFR1 و FGFR2 را نشان داد (۲۳) به طوریکه بیان FGFR1 و FGFR2 به طور معنی داری با سرطان ریه مرتبط بودند همچنین نتایج تایید کننده ارتباط بین دو ژن به عنوان بیومارکر برای سرطان ریه می باشد (۲۴). در

Investigating the Expression of EGFR and FGFR4 Genes in Patients with Lung Cancer

M. Chitsaz (MSc)¹, A. Hesampour (PhD)^{*1}

1.Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(4); Apr 2018; PP: 17-23

Received: Nov 26th 2017, Revised: Feb 24th 2018, Accepted: Apr 17th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Lung cancer is a disorder that is caused by genetic and epigenetic changes and activates oncogenes and inactivates tumor suppressor genes. The aim of this study is to quantitative evaluation of EGFR and FGFR4 genes expression level in blood samples of lung cancer in compare with normal people to investigate the role of these two genes as biomarkers during lung cancer diagnosis and screening.

METHODS: This case-control study was performed on 50 blood samples of lung cancer patients compared with 50 normal controls.. Total RNA from Blood samples were extracted and cDNA is synthesized. The specific primers for detection of markers are designed and expression level of BRIP1, PALB2 in presence of gene GAPDH by using Real Time PCR method was quantitatively studied.

FINDINGS: Significant increase was observed in the expression of target biomarkers in cancer patients compared to control population. Results showed quantitative increase of FGFR4 and EGFR genes with 4.46 and 3.03 fold respectively for lung cancer in compare with normal samples ($p=0.003$). Also, there was a significant relationship between grade of the disease and biomarkers expression level, so that with increasing the stage and degree of severity of cancer, the expression of biomarkers increased ($p=0.003$).

CONSLUSION: Based on this study results we could predict the expression level of (EGFR, FGFR4) gens in suffered patients quantitatively which could use as biomarker indicator during screening of lung cancer samples.

KEY WORDS: EGFR, FGFR4, Real Time PCR, Marker, Lung Cancer.

Please cite this article as follows:

Chitsaz M, Hesampour A. Investigating the Expression of EGFR and FGFR4 Genes in Patients with Lung Cancer. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(4):17-23.

***Corresponding Author: A. Hesampour (PhD)**

Address: Department of Biology, central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran.

Tel: +98 21 44600182

E-mail: a.hesampour@gmail.com

References

1. Hassan Lemjabbar-Alaoui, Omer Hassan, Yi-Wei Yang, Petra Buchanan. Lung cancer: biology and treatment options, *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(2):189-210.
2. Stephen S. Hecht. Lung Carcinogenesis by Tobacco Smoke. *Int J Cancer*. 2012;131(12):2724-32.
3. Klaus Schmid, Torsten Kuwert, Hans Drexler. Radon in Indoor Spaces. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(11):181-6.
4. Yousheng Mao, Ding Yang, Jie He, Mark J. Krasna, *Epidemiology of Lung Cancer*. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;439-45.
5. Richard W. Clapp, Molly M. Jacobs, Edward L Loechler. Environmental and occupational causes of cancer new evidence, 2005–2007. *Rev Environ Health*. 2008;23(1):1-37.
6. Jill E. Larsen, John D. Minna, molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):703-40.
7. Chan BA1, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(1):36-54.
8. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New Eng J Med*. 2004;350(21):2129-39.
9. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung Cancer Mutation Profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-Analysis and Comparison of Never and Ever Smokers. *Lung Cancer*. 2016;102:122-34.
10. Pamela Villalobos, Ignacio I. Wistuba, Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2017; 31(1):13-29.
11. Guillermo J, Pasi A, Jeffrey L, Tracy S, Greulich H, S Herman, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Sci*. 2004, VOL304.
12. Heidi Greulich and Pamela M. Pollock, Targeting mutant fibroblast growth factor receptors in cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(5).
13. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13306-11.
14. Jenifer L, Michael D, Maureen F, Zakowski L, Kasai Y, Broderick S, et al. Mutational analysis of egfr and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in fgfr4. *PLoS ONE*. 2007;2(5):426.
15. Wei Xu, Yan Li, Xueli Wang, Bo Chen, Yan Wang, Shifeng Liu, Jijun Xu, Weihong Zhao, Jianqing Wu. FGFR4 transmembrane domain polymorphism and cancer risk: A meta-analysis including 8555 subjects. *Eur J Cancer*. 2010;3332-8.
16. Dacic S, Flanagan M, Cieply K, Ramalingam S, Luketich J, Ch Belani, SA Yousem. Significance of egfr protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:860-5.
17. Feng Li, Yongmei Liu, Huijiao Chen, Dianying Liao, Yali Shen, Feng Xu, Jin Wang. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *licensee Bio Med Central Ltd*. 2011.
18. Ling Huang, She-Juan An, Zhi-Hong Chen, Jian Su, Hong-Hong Yan, Yi-Long Wu. MET expression plays differing roles in non-small-cell lung cancer patients with or without egfr mutation. *J Thor Oncol*. 2014;9(5).
19. Willemijn SME, Mittempergher L, Willems SM, Bosma AJ, Dennis DGC P, V Noort, et al. FGFR1, 2 and 3 protein overexpression and molecular aberrations of FGFR3 in early stage non-small cell lung cancer. *J Pathol Clin Res*. 2016;2(4):223-33.

20. Glatzel-Plucinska N, Piotrowska A, Grzegorzolka J, Olbromski M, Rzechonek A, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. SATB1 level correlates with ki-67 expression and is a positive prognostic factor in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res.* 2018;38(2):723-36.
21. Choi CH^{1,2}, Chung JY¹, Kim JH³, Kim BG⁴, Hewitt SM. Expression of fibroblast growth factor receptor family members is associated with prognosis in early stage cervical cancer patients. *J Transl Med.* 2016;14(1):124.
22. Asgari Y, Khosravi P, Zabihinpour Z, Habibi M. Exploring candidate biomarkers for lung and prostate cancers using gene expression and flux variability analysis. *Integr Biol (Camb).* 2018;19.
23. Wei H, Liang F, Cheng W, Zhou R, Wu X, Feng Y, Wang Y. The mechanisms for lung cancer risk of PM2.5: Induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human non-small cell lung cancer cells. *Environ Toxicol.* 2017;32(11):2341-51.
24. Yuan-Xiang Shi, Ji-Ye Yin, Yao Shen, Wei Zhang, Hong-Hao Zhou, Zhao-Qian Liu. Genome-scale analysis identifies NEK2, DLGAP5 and ECT2 as promising diagnostic and prognostic biomarkers in human lung cancer. *Sci Rep.* 2017;7:8072.
25. Hong-ping Huang, Hui Feng, Hong-bo Qiao, Ze-xiang Ren, Ge-dong Zhu. The prognostic significance of fibroblast growth factor receptor 4 in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2015;8:1157-64.
26. Ravi Salgia. Fibroblast growth factor signaling and inhibition in non-small cell lung cancer and their role in squamous cell tumors. *Cancer Med.* 2014;3(3):681-92.
27. Katoh M. Therapeutics targeting fgf signaling network in human diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2016. 37(12):1081-96.
28. Ricordel C, Friboulet L, Facchinetti F, Soria JC. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs in EGFR T790M-mutant lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29:28-37.